

OCT 31 2002

TECH CENTER 1600/2900

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Klaus Unsicker, Jens Pohl, Michael Paulista and Rolf Bechtold

Application No.: 09/527,275 Group: 1646

Filed: March 17, 2000 Examiner: O. Chernyshev

For: Cytokines Having Neurotrophic Activity

CERTIFICATE OF MAILING	
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202	
on <u>9/13/02</u>	<u>K. Unsicker</u>
Date	Signature
<u>KLAUS UNSICKER</u>	
Typed or printed name of person signing certificate	

CERTIFICATE OF MAILING	
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202	
on <u>10/22/02</u>	<u>Carol M. Bowerman</u>
Date	Signature
<u>Carol M. Bowerman</u>	
Typed or printed name of person signing certificate	

DECLARATION OF INVENTORS UNDER 37 C.F.R. § 1.131

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

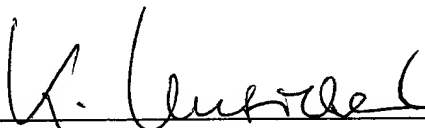
Sir:

We, Klaus Unsicker, a resident of Heidelberg, Germany, Jens Pohl, a resident of Hansbrücken, Germany, Michael Paulista, a resident of Leimen, Germany, and Rolf Bechtold, a resident of Heidelberg, Germany, declare that:

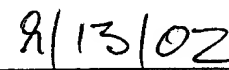
1. We are co-inventors of the above-referenced U. S. Patent Application.
2. We have read U. S. Patent Application No. 09/527,275 and the Office Action mailed from the United States Patent and Trademark Office September 14, 2001 and May 31, 2002.

3. We hereby state that the invention described and claimed in U.S. Patent Application No. 09/527,275 was completed in Germany, a World Trade Organization (WTO) member country, before June 5, 1997, the effective publication date of Louis, "Methods For Treating Photoreceptors Using Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Protein Product," WO 97/19694.
4. Completion is evidenced by the enclosed Exhibits A-C, which represent copies of laboratory notebook pages 269-280, 281 and 282-287, which demonstrate the following:
 - Exhibit A Pages 269-280 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of ciliar ganglion neurons (CG-Assay). This assay demonstrated the synergism of TGF- β with GDNF, which is also presented as Figure 6 in the present application.
 - Exhibit B Page 281 shows that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of paravertebral sympathetic neurons (Bio-Assay/SG-Assay). The combination of TGF- β and GDNF demonstrated a synergistic neurotropic effect on paravertebral sympathetic neurons.
 - Exhibit C Pages 282-287 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of sensoric spinal ganglion neurons (DRG-Assay). This assay demonstrated that the TGF- β and GDNF cytokine combination provided a synergistic neurotropic effect on dorsal root ganglion neurons.
5. In accordance with United States Patent and Trademark Office procedures, the dates recorded on these laboratory notebook pages have been redacted.

6. We further declare that all statements made herein of our own knowledge are true and that all statements made on information or belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under § 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements, if made, may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.



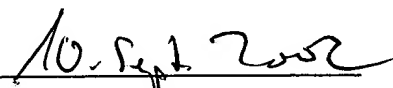
Klaus Unsicker



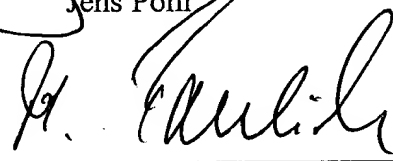
Date



Jens Pohl



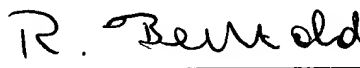
Date



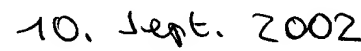
Michael Paulista



Date



Rolf Bechtold



Date

CG - Assay:

2 Platten

Proben: TGF β 1, GDNF, TGF β 1 + GDNF, F3, VP, VP + TGF β 1,
F3 + TGF β 1, F3 + GDNF, VP + GDNF; siehe Protokoll

ca. 1100 Zellen / well

CG - Assay:

Stoppen der Platten mit Glutaraldehyd
(Montag gezählt)

CG - Assay:

2 Platten

Proben: TGF β 1, GDNF, TGF β 1 + GDNF, F3, VP, F3 + GDNF,
VP + GDNF, F3 + TGF β 1, VP + TGF β 1; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG - Assay:

Stoppen der Platten mit Glutaraldehyd

B49: Überstand + Zellen vom 25.06.
TCA - Fällg. 1.5 ml 200 μ l PBS

+ TCA \rightarrow Protein - Fällat \rightarrow in Proteingel aufgetragen

DB:

50 μ l B49 Überstand bzw. Lyolat + 50 μ l DB - Puffer.
Je 2 μ l N-glycosidase-F hinzugeben.
17h bei 37°C Inkubation

CG - Assay:

12 Platte

Proben: VP, F3, VP + α GDNF, VP + α TGF β 1, F3 + α TGF β 1, TGF β 1 + GDNF; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

EXHIBIT

A

Western-Blot

B49

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	LMU	/	RA	G2	G3	/	U	U/DG	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
/	LMU	/	G1	G2	G3	/	2	2/DG	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$$U = 125V; \quad I_A = 70 \text{ mA}; \quad I_E = 32 \text{ mA}$$

$$t = 1h. 15'$$

15' Äquilibrieren in Transferrpuffer; NC-Membran + Gel

Blot: 15' = t; $U = 9-12V$; $I = 0.22A$

2-3' Ponceau-S
1h Block
1. AK

C6-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

U-Blot: 3×10^6 Zellen mit TTBS
2. AK (1:5000)

Chromaffine: 2 NN \rightarrow Mark \rightarrow Präparation siehe Protokoll
 $\rightarrow 178 \cdot 10^6$ Zellen \rightarrow 25 Flaschen
(1:5) $\rightarrow 1.4 \cdot 10^6$ Zellen / Flasche

U-Blot: 3×10^6 Zellen mit TTBS
 \rightarrow ECL

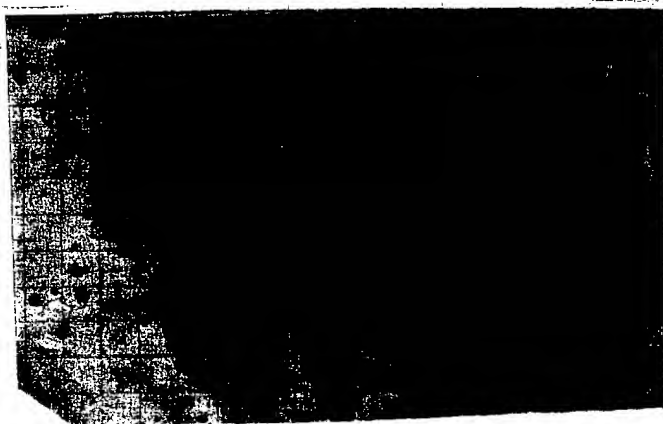
(PAGE v. 19.07.)

10

Üfestand

Lysat

Gel



1,5'



3'



B49: Üfestand + Zellen

Stimulation:

30h → mit

a) 10 μ M Acetylcholin + 10 μ M Eserin n=10b) 50 μ M Nicotin n=5~~2~~ 2 Kontrollen für b) 4 Kontrollen für a)

Durchführung: i) 2 ml Medium

ii) 15' Stimulation → Medium (daran 1
2 μ l Stabilisierungspuffer für HPLC)iii) 10' Lysat → H₂O

Prot $F3, VP, F3 + TGF\beta 1, GDNF, F3 + TGF\beta 1 + GDNF$
 $VP + TGF\beta 1, VP + GDNF, + GDNF + TGF\beta 1, TGF\beta 1 + GDNF$
 $TGF\beta 1 + GDNF, F3 + \alpha GDNF, F3 + \alpha TGF\beta 1, VP + \alpha GDNF$
 $VP + \alpha TGF\beta 1$; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2 Platten
 Problem: $GDNF, TGF\beta 1, FGF-2$; ~~WDM~~ Kombinationen;
 siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

Chromaffine: 1 NN \rightarrow Mark \rightarrow Präp nach Protokoll
 $\rightarrow 428.000$ Zellen / CS $\rightarrow 856 \cdot 10^4$ Zellen
 auf Cover slips ausgesät für EM
 (ca. 2ml eingesetzt)

CG-Assay: 12 Platte
 Problem: unbelagt bzw. zu wenig

CG-Assay: 2 Platten
 Problem: $F3, VP, \alpha TGF\beta 1, \alpha GDNF, TGF\beta 1, GDNF$
 $D1-5, I1-3, II1+2, III1+2, IV1-3$ ACA-Fractionen;
 siehe Protokoll
 (ca. 1200 Zellen / well)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2e Platte
Proben: D2+3, II1, IV1, F3, GDNF, TGF α 1; siehe Protokoll

Protein-Fällg: Chromaffine vom 25.05. und vom 11.07.
Überstand nach Stimulierung und Lysat

Protokoll \rightarrow 3000 rpm (Heraeus) für 30' \rightarrow Überstand
Max. rpm (---) für ca. 1h \rightarrow ---
10% TCA Endkonzentration \rightarrow Vortex \rightarrow für 1h (oder 1/2h)
auf Eis \rightarrow 4000 rpm (Heraeus) für 15' \rightarrow Pellet
je 1ml Aceton \rightarrow 4000 rpm (Heraeus) für 15' \rightarrow
je 1ml MeOH \rightarrow 4000 rpm (---) für 15'

Pellet in Proteinpuffer aufschwemmen (4-6M Harnstoff)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

SDS-PAGE: 15% T Laemmli, red.

LF-Blot

Chr. 25.05.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	LMW	/	G1	G2	G3	/	Ü	Lysat	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

Chr. 11.07.

/	LMW	/	G1	G2	G3	/	Ü	Lysat	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$U = 125V$; $I_A = 76mA$; $I_E = 35mA$; $t = 14\ 20'$

Äquilibrieren der NC-Membran + Gel für 15' in Transferpuffer

Blot: $t = 15'$; $I = 0.22A$; $U = 9-12V$

1h Block; 1.4k

W-Blot: 3×10^6 mit TTBS waschen; 2. Ak

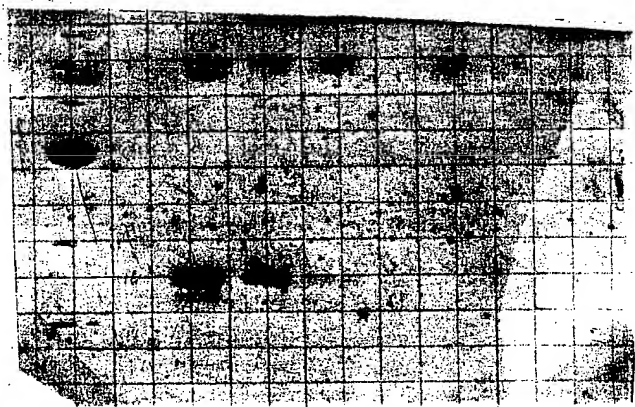
Chrom: Präparation nach Protokoll; 2 Nebenlinien
→ $176.25 \cdot 10^6$ Zellen → $1.175 \cdot 10^6$ Zellen / Flasche

W-Blot: 3×10^6 mit TTBS waschen → ECL

94
67
43
30
20
10

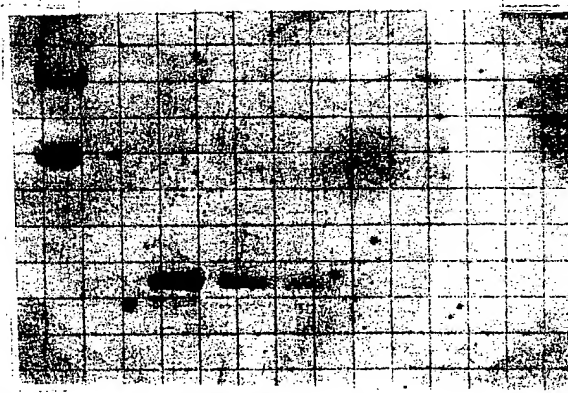
11
11
11
11
11
11

25.05.



1'

11.07.



3'



Proben F3; TGF β 1; GDNF; α 1GT β ; GDNF; TGF β 2;
Auftragungen siehe Protokoll
ca. 1200 Zellen / well

Stimlg.: 30h \rightarrow Stimulierung mit 10 μ M Acetylcholin + 10 μ M Serin
(ca. 2:00 Uhr)
Medium: 2ml
Stimulierung: 2ml; davon 100 μ l + 2 μ l Stabilisierungspuffer für HPLC
15' = t
Lyse: 2ml H₂O; t = 10' (+ Zellen)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2 Platten
Proben: TGF β 1; GDNF; Auftragungen siehe Protokoll
ca. 1300 Zellen / well

CF-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

Protein-Fällg.: Chromatins: Lyolat und Überstand nach Stimulierung.

- 30' bei 3000 rpm (Heraeus) \rightarrow Überstand
- Maximale rpm (Heraeus) für ca. 1h \rightarrow Überstand
- 10% TCA - Endkonzentration \rightarrow Vortex \rightarrow für 1h auf Eis
- 15' bei 4000 rpm (Heraeus) \rightarrow Pellet
- je 1ml Aceton \rightarrow 15' bei 4000 rpm (Heraeus)
- je 1ml MeOH \rightarrow "

Pellet in Proteinpuffer + ca. 618 M Harnstoff aufnehmen

~~CG-Assay~~

SDS-PAGE

+
Western-Blot

15% T - Laemmli, red.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Gel 1+2 / LMW / G1 G2 G3 G4 G5 G6 /
 / 5 / 10 ————— 10 /

$t = 14 \text{ } 15'$

Western - Blot : 1. Amersham NC-Membran
 2. Bio Rad

15' Äquilibration

15' Blot ($I = 0.2 \text{ A}$; $U = 12-18 \text{ V}$)

60' Block

1. 4K

CG - Assay : CNTF + 1K's
 F3, V_i + 4K's Antiträgung siehe Protokoll
 → 4th !

CG - Assay : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG - Assay : 2 Platten

G + T↓ und T + G↓ → Ausgang : 2n, 1ml
 Antiträgung siehe Protokoll
 Auswertung ---

CG - Assay : Stoppen mit Glutaraldehyd

Western Blot : 3x Waschen für 10' mit TTBS
 2. 4K

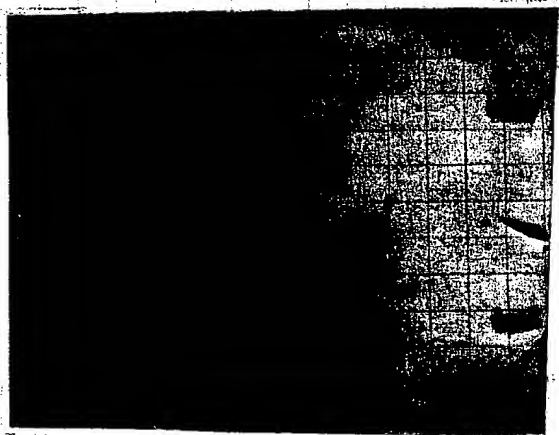
Western Blot

ECL

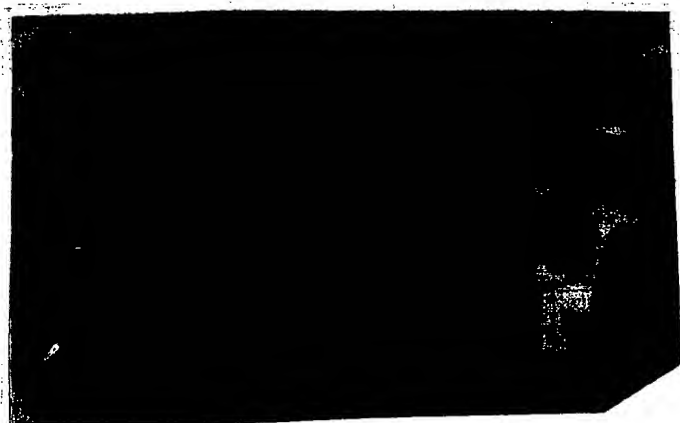
10' Waschen mit TT

Amesham

Bio Rad



1'



3'

B49:

Life stand

→

Dialyze

Chromaffin:

Präparation und Aufarbeitung nach Protokoll

→ $2.5 \cdot 10^6$ Zellen

CG-Assay:

2 Platten

Proben: T+G↓ und G+T↓ (Ausgang: 2x1ml)

Anfragerung und Auswertung siehe Protokoll

Chromaffine:
(3:00 Uhr)

nach 30h Stimulation mit $10\mu\text{M}$ Acetylcholin + $10\mu\text{M}$ Brin

Medium: 2ml

Stimulation: 2ml (davon $100\mu\text{l}$ + $2\mu\text{l}$ Stabilisierungspuffer für HPLC); $t = 15'$

Lyse: 2ml H_2O ; $t = 10'$ 1 + Zellen $\rightarrow -80^\circ\text{C}$

CG-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay:

2 Platten

Proben: CNTF, T3, V1 (+ Akt's)

Anfragerung + Auswertung siehe Protokoll

CG-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

SDS-PAGE

15% T-Lösungsmittel, red.

Western Blot

1. NC-Membran Bio Rad
2. -v- Millipore

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Gel 1+2

✓ LML (12M) ✓ G1 G2 G3 G4 G5 GG ✓
✓ 5 (4) ✓ 10 < ————— > 10 ✓

$t = 14-15'$

$U = 125\text{V}$

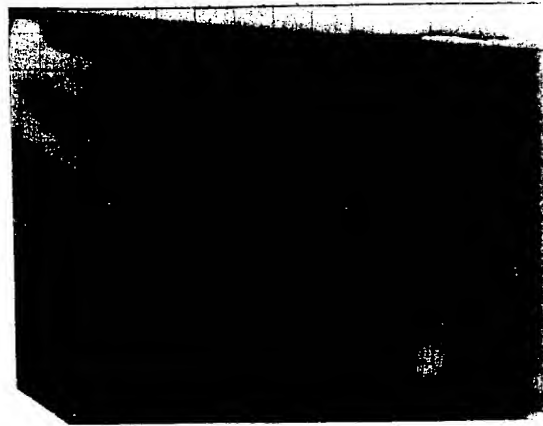
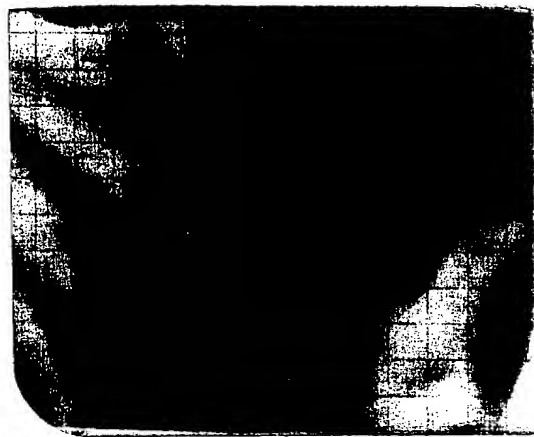
Start: $15' = t$ < $15'$ Äquil.
60°C → 1.1M

at 62 min

lissimys

7000

50°C



CG - Assay:

versch. FCS - Chargen (+ GDNF)
Anstrahlung + Anverkung siehe Protokoll

CG - Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

Western - Blot:

3 x 10⁵ Zellen mit TTBS
2.4K

SDS - PAGE

+

Western Blot

NT - Lämmli red.

1. NC - Immunoblot Bio Rad

2. -11- Anzeigegerät

/ K / G1 G2 G3 G4 G 6.6 /

/ 4 / 10 ← ————— → 10 /

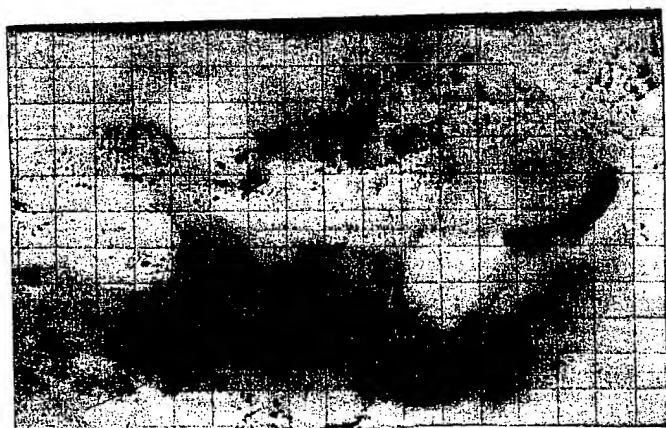
$t = 14 \text{ } 15'$ $U = 12.5V$

Bio Rad

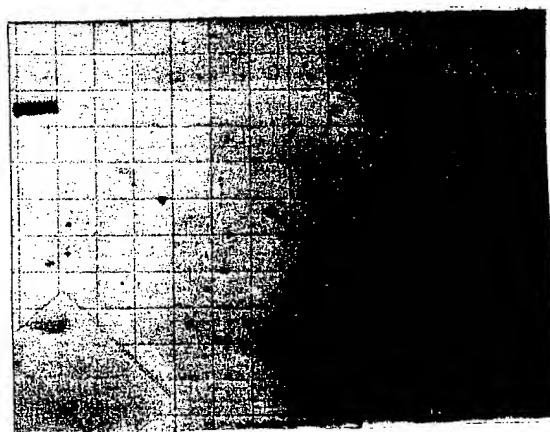
Amesham



1'



3'



Blot: $t = 15'$; *Agar & brine*
 $t = 15'$; Blot
 $t = 60'$; Block
 1 4K

$I = 0.2A$; $U = 12-18V$

Western Blot : 3x 10' Vaschen mit TTBS
ECL

Western Blot : 3x 10' Vaschen mit TTBS
ECL

CG-Array : A) "normal" 2 Platten
B) nach "MN-Behandlg."

A) 127.500 Zellen → 1275 Z/well
B) 262.500 " → MN-Beh. → 97.000

Auftragung und Auswertung siehe Protokoll
(MN-Beh.: BSA-Kissen, Putrizannde, BSA-K., graining)

MLEC-Array : 12 Platte
Zellen ausgerät 36 Zellen; Protein aufgetragen
über Nacht ink.
Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

CG-Array : Stoppen mit Fluoresceindihydroxyd

Western-Blot : 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

MLEC-Array : 1x Vaschen mit PBS
Lyse Puffer (100µl/well) für 2-3 h bei RT
80µl Lyse ablesen und miszen - siehe Protokoll

Bio-Array : CG E12 / SG E12 / SG E8
Proben: TGF α 1; GDNF; ~~Wnt3~~ siehe Protokoll

CG/E12: 155.000 Zellen → 1290 Zellen/well → Stop 12-09
SG/E12: 345.000 " → 3450 Zellen/well → } Stop 14-09
SG/E8: 132.500 " → 1950 Zellen/well

EXHIBIT

B

SG : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG : FCS : verschiedene Chargen
TGF β 1 ; GDNF siehe Protokoll
165.000 Zellen \rightarrow 1375 Zellen/well

Bio-Assay : CG / DRG / SG : E12 siehe Protokoll
 ↓ ↓ ↓
 18-09 19-09 20-09 Stop

CG:	155.000	Zellen	\rightarrow	1290	} Zellen/well
DRG:	142.500	--	\rightarrow	1190	
SG:	177.500	--	\rightarrow	1480	

Problem: TGF β 1 ; GDNF

SDS-PAGE : 15% T Lämmli ; red.

Western Blot

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RM	/	G1	G2	G3	F	DG/F	G3	/
/	4	/	\leftarrow	10	\rightarrow	\rightarrow 20	\rightarrow	10	/

$t = 1h\ 25'$ $U = 125V$ $I_A = 66mA$ $I_E = 33mA$

Blot : $t = 15'$ äquilibrieren
 $t = 15'$ bloßen
 $t = 60'$ Blocklösg.
 n. Ak $I = 0.2A$; $U = 16-19V$

EXHIBIT

C

2.5'

1'

CG: Stoppen mit Glutaraldehyd

Bio-Assay: DRG / E8 → Stop 20-09 siehe Protokoll
CG / DRG / SG E12
↓ ↓ ↓
19-09 20-09 21-09 Stop -11-

DRG / E8:	160.000 Zellen	→	1300	Zellen / well
CG / E12	180.000	-11-	→	1250
DRG / E12	180.000	-11-	→	1125
SG / E12	260.000	-11-	→	1300

} Zellen / well

Western-Blot: 3x 10' Flaschen mit TTBS
2. AK

Bio-Assay: CG / DRG / SG E12
21-09 22-09 23-09 Stop siehe Protokoll
CG 180.000 Zellen → 1375 Zellen / well

Western Blot: 3x Flaschen je 10' mit TTBS
ECL

Bio - Assay: (2x) DRG / SG E8 Stop siehe Protokoll

DRG :	332.500	Zellen	→	1385	} Zellen/well
SG :	49.500	-11-	→	830	

Bio - Assay: CG / DRG E10 Stop } siehe Protokoll

DRG / E14 rat 27-07 Stop

CG	E10	135.000	Zellen	→	1125	Zellen/well
DRG		79.968	-11-	→	1176	-4-
DRG	E14 rat	156.000	-11-	→	1300	-4-

Bio - Assay: CG / DRG E10 Stop siehe Protokoll

CG	125.000	Zellen	→	1250	Zellen/well
DRG	135.000	-11-	→	1350	-11-

Bio - Assay: CG / DRG / SG E8 Stop siehe Protokoll

DRG: 125.000
SG: 80.000

→ 1.170
→ 1.180

2.110

DG: 20% HS + 20% FCS

20 μ l Serum + 80 μ l Protein buffer + 2 μ l F-6lycanase
17h bei 37°C inkubieren → Stop 09-10

SDS-PAGE
+
Western Blot

15% T Laemmli, red

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RH	/	G1	G2	G3	/	HS	DG HS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/
/	RH	/	G1	G2	G3	/	FCS	DG FCS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/

t = 1h 20' U = 125V I_A = 76mA I_E = 39mA

Slot:

t = 15' Aguilibration
t = 15' ; I = 0.2A ; U = 13-17V
t = 60' Block
1. AK

Slot

FCS



14

3



1'

SG 225.000 Zellen → 1400 Zellen/well

Western-Blot: 3x 10' mit TTBS waschen
2. AK

Western-Blot: 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

Bio-Assay: SG / E12 siehe Protokoll

SG: 270.000 Zellen → 1350 Zellen/well
Stop: 14-10

Bio-Assay: CG / DRG E8
15-10 16-10 stop siehe Protokoll

CG:	152.500	Zellen	→	1270	} Zellen/well
DRG:	160.000	"	→	1333	

Bio-Assay:

SG / E8 → stop: 19-10

CG / DRG / SG E10
17-10 18-10 19-10 stop } siehe Protokoll

SG / E8 : 92.500 Zellen → 1160 Zellen/well

CG	110.000	"	→	1100	} Zellen/well
DRG / E10	130.000	"	→	1080	
SG	115.000	"	→	1150	

Bio - Assay:

CG 1 DRG / SG E8
22-10 23-10 24-10

Stop

nicht Protokoll

CG	120.000	Zellen	→	1200	} Zellen/well
DRG	100.000	-"-	→	1250	
SG	120.000	-"-	→	1200	

Bio - Assay:

CG 1 DRG / SG E10
24-10 25-10 26-10

Stop

nicht Protokoll

neues BSA

④ = CNF 10 ng/ml

CG	100.000	Zellen	→	1250	} Zellen/well
DRG	130.000	-"-	→	1300	
SG	175.000	-"-	→	1250	

Bio - Assay:

CG 1 DRG / SG E12
26-10 27-10 28-10

Stop

nicht Protokoll

CG:	75000	Zellen	→	1100	} Zellen/well
DRG:	120.000	-"-	→	1200	
SG:	185.000	-"-	→	1320	

Bio - Assay:

CG 1 DRG / SG E9
31-10 1-11 2-11

Stop

nicht Protokoll

CG:	115.000	Zellen	→	1440	} Zellen/well
DRG:	125.000	-"-	→	1250	
SG:	130.000	-"-	→	1300	

Bio - Assay:

CG 1 DRG / SG E10
1-11 2-11 3-11

Stop

nicht Protokoll

CG	110.000	Zellen	→	1250	} Zellen/well
DRG	125.000	-"-	→	1250	
SG	120.000	-"-	→	1200	